

(26)

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number : 05-230088
(43) Date of publication of application : 07.09.1993

(51) Int. Cl. C07F 9/6574
C07F 9/09
C12P 9/00
// A61K 31/665
(C12P 9/00
C12R 1:645)

(21) Application number : 04-262478 (71) Applicant : MITSUBISHI KASEI CORP
(22) Date of filing : 30.09.1992 (72) Inventor : MUROFUSHI KIMIKO

(30) Priority

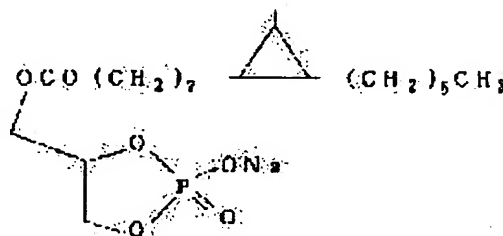
Priority number : 03252181 Priority date : 30.09.1991 Priority country : JP

(54) NEW PHYSIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCE AND ITS PRODUCTION

(57) Abstract:

PURPOSE: To industrially and advantageously obtain a new physiologically active substance expected to have utility as an anti-cancer medicine, having inhibitory activity against DNA polymerase α by culturing a haploid ameba of *Physarum polycephalum* of true *Myxomycetes* in a culture.

CONSTITUTION: A haploid ameba of *Physarum polycephalum* MCI-2,526 of true *Myxomycetes* is inoculated into a liquid medium, cultured at 24° C for one day at a dark place, 2-3 drops of the culture solution is dripped on an agar medium, spread to the whole face, further cultured at 24° C for two days at a dark place, *Aerobacter aerogenes* MCI-2,517 as a feed of the ameba of *Myxomycetes* is inoculated to the agar medium and the haploid ameba is cultured at 24° C for four to five days at a dark place. The haploid ameba is collected from the agar medium, subjected to an ultrasonic grinder and centrifuged to collect a supernatant, which is extracted with a chloroform/methanol solvent and the extract is purified by chromatography to give the objective new physiologically active substance of the formula.



LEGAL STATUS

26

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平5-230088

(43) 公開日 平成5年(1993)9月7日

(51) Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F. I.	技術表示箇所
C 0 7 F 9/6574		Z 7106-4H		
	9/09	K 7106-4H		
C 1 2 P 9/00		8114-4B		
// A 6 1 K 31/665	ADU	8314-4C		
(C 1 2 P 9/00				

審査請求 未請求 請求項の数2(全13頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平4-262478

(71) 出願人 000005968

三菱化成株式会社

(22) 出願日 平成4年(1992)9月30日

東京都千代田区丸の内二丁目5番2号

(31) 優先権主張番号 特願平3-252181

(72) 発明者 室伏 きみ子

埼玉県浦和市辻4-12-17

(32) 優先日 平3(1991)9月30日

(74) 代理人 弁理士 長谷川 一

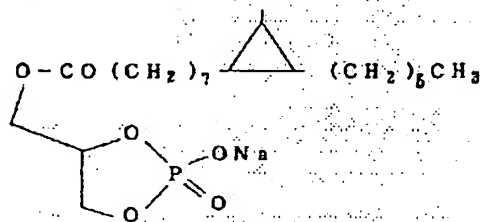
(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(54) 【発明の名称】 新規生理活性物質及びその製造法

(57) 【要約】

【構成】 下記式

【化1】



で表される新規生理活性物質、および、真性粘菌フィザルム・ポリセファラムを培養することを特徴とする同物質の製造方法。

【効果】 本発明の新規生理活性物質は、DNAポリメラーゼα阻害活性を有しており、抗癌剤としての有用性が期待される。

(2)

特開平5-230088

【特許請求の範囲】

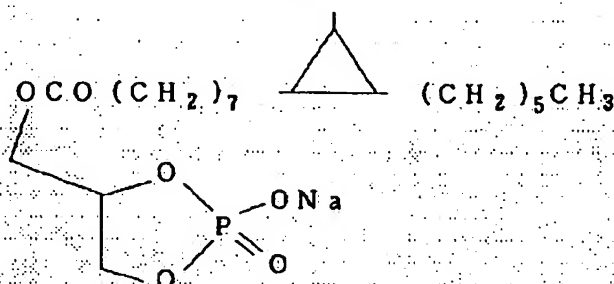
【請求項1】 下記式

1

2

*【化1】

*



で表される新規生理活性物質。

【請求項2】 真性粘菌フィザルム・ポリセファラム (*Physarum polycephalum*) の単相アメーバを培地中で培養することを特徴とする請求項1記載の新規生理活性物質の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

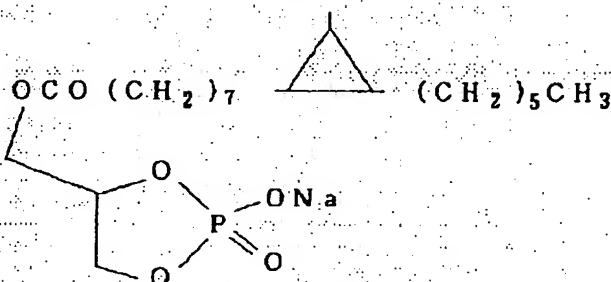
【産業上の利用分野】 本発明はDNAポリメラーゼα阻害活性及び細胞増殖阻害活性を有する新規生理活性物質と、その製造法に関する。

【0002】

【従来の技術および発明が解決しようとする課題】 従来、種々の抗癌剤が医薬品として実用化されている。しかしながら、副作用の問題などから、医療分野において、現在も新規な抗癌剤が求められている。

【0003】

※



【0007】 以下、本発明につき詳細に説明する。本発明の新規生理活性物質は上式で表される。該生理活性物質は例えば変形菌綱 モジホコリ目 モジホコリ科 モジホコリ属に属する菌によって生産される。かかる生産菌としては、例えばフィザルム・ポリセファラム (*Physarum polycephalum*) MCI 2526 が挙げられ、かかる菌株は微工研菌寄第11576号 (FERM P-11576) として寄託されている。

【0008】 フィザルム・ポリセファラム (*Physarum polycephalum*) MCI 2526 (以下、「MCI 2526号菌」と略す) の微生物学的性状は以下の通りである。

【0009】 1) 形態学的特徴

※【課題を解決するための手段】 本発明者らは、真性粘菌フィザルム・ポリセファラム (*Physarum polycephalum*) MCI 2526の単相アメーバより細胞増殖阻害活性のある生理活性物質を発見し、その産生する物質について単離、精製を行った。

【0004】 その結果、この物質はDNAポリメラーゼα阻害活性を有し、特に癌細胞に対し、強い阻害活性を有するとの知見を得て、その単離・精製を行い、新規な生理活性物質を得るに至り、本発明を完成した。

【0005】

【問題点を解決するための手段】 即ち、本発明の要旨は下記式で表される新規生理活性物質及びその製造法に存する。

【0006】

【化2】

複相 (2n世代) の変形体は、朽ちた倒木や落葉上で生活し、腐敗した植物体や、その上で繁殖するバクテリアを餌としている。黄色の色素を持つ半透明ゼラチン状の生物体で、網目状に平たく広がり、大きさは数cmから数十cmに及ぶ。厚さは0.5～数mm程度である。この変形体は細胞壁のない1個の細胞からできており、内部には多数の直径約3μmの核を持つ。変形体の生長に伴ない、核は分裂を繰り返し、他の細胞内小器官も数を増すが、細胞質分裂は起こらない。餌を探して巨大なアメーバ様に移動し生長を続けるが、生長中の変形体は湿った暗所を好む。成熟すると、倒木の樹皮の割れ目や落ち葉の下から、光の当たる乾いた場所へと移動し、そこで子実体を形成する。子実体は高さ1～1.5mmで、原形質が集合し上へ伸びてできた柄の上に、枕状の形をした胞

(3)

特開平5-230088

3

子嚢が数個付着する。1個の胞子嚢の直径は0.3~0.5mm、胞子嚢の色は暗い紫褐色で、胞子嚢の袋(表皮)に石灰が付着しているために、乾燥すると白っぽく見える。子実体は、倒木や落ち葉の上に直接生じているのではなく、変形膜と呼ばれる透明な膜を介して倒木などにしっかり付着している。

【0010】胞子は厚膜に包まれており、形は丸く、直径は約8μm、表面にトゲ状の突起を持つ。色は暗紫色。胞子嚢には細毛体と呼ばれる中空の細い管が存在し、胞子嚢の形を保ち、また胞子の飛散に役立っている。直径約10cmの変形体から100個以上の子実体が形成され、それぞれの子実体では、100万個もの胞子が作られる。

【0011】胞子が適当な温度、湿度の条件下で発芽すると、単相(n世代)のアメーバ(ミクソアメーバ)となる。このアメーバは、複相の変形体とは全く独立に生活することができ、細胞分裂を行って増殖する。単相アメーバは直径約10μmで色素を持たない。固体上では一般的な土壌アメーバと同様な挙動を示し、細胞ははっきりした極性を持たないが、水中では2本の鞭毛を生じ、はっきりした極性を持つようになる。生存に不適当な条件下では、周囲に主としてガラクトサミンとタンパク質から成る細胞壁を形成し、休眠型細胞であるシストとなる。シストは、直径約5μmの球形細胞である。単相アメーバの内部には直径約3μmの核が1個存在するが、この核は変形体の核と形態的には区別できない。ミトコンドリアは原生動物のものとよく似ていて、電子密度の高いヌクレオイド構造を持っている。大きさは変形体のものと変わらない。小胞体は、粗面、滑面のいずれもがよく発達しており、ゴルジ体は核の近くに存在する。(変形体では、小胞体、ゴルジ体は、鮮明には観察されない。)中心子と基底小体は単相の時期にのみ見られる構造で、中心子の大きさは180nm×470nmである。単相アメーバは配偶子に相当し、雄と雌とに相当するもの同士が会おうと、接合して、複相(2n世代)になる。複相の接合子は、融合と核分裂を繰り返して、黄色い色素を持った変形体へと生長する。本発明には、以上述べた生活環のうち、単相アメーバを生理活性物質生産菌として用いた。

【0012】2)生理学的性質

単相アメーバについて述べる。

【表1】

①最適生育条件

最適pH: 5~7(寒天培地上, 5日間培養)

最適温度: 20~25℃(寒天培地上, 5日間培養)

②生育の範囲

pH範囲: 4~8(寒天培地上, 5日間培養)

温度範囲: 10~30℃で生育(寒天培地上, 5日間培養)

35℃以上では細胞壁を作って休眠型細胞(シスト)と

4

なる。

【0013】3)分類学的考察

①高次の分類学上の位置

変形菌類は、主として子実体の形態によって分類がなされている。本菌体は、(1)胞子嚢を作り(内生胞子)、(2)胞子の色は暗い紫褐色で、(3)胞子嚢表皮に顆粒状の石灰質の結晶を蓄積しており、(4)細毛体は表面に突起模様を持たないことから、*Mycetozoa*; ed. 3. British Museum. (Nat. Hist.) London (1925), *The Myxomycetes*; pp. 561, Univ. of Iowa Press, Iowa (1969), *The Myxomycetes in "The Fungi: An Advanced Treatise"*; vol. 4B, pp. 39, Acad. Press, New York (1973), *Myxomycetes*. Flora Neotropica Monogr. No. 16, pp. 304, New York Bot. Gard., New York (1976) による分類に基づき、変形菌綱(Myxomycete)モジホコリ目(Physarales)モジホコリ科(Physaraceae)に帰属することが明らかである。

【0014】②属レベルの同定

前述①の文献によってMCI 2526号菌の帰属を検討すると、(1)胞子嚢の形が枕状で、(2)出来上がったばかりの胞子嚢は、オレンジがかった黄色だが、それが成熟し乾燥するに従って、白味を帯びた紫褐色となり、(3)透明で繊細な細毛体が枝分かれしたりつながったりして網目を作っている。また、(4)柱軸を持っていることから、モジホコリ属(*Physarum*)に帰属することは明らかである。

【0015】③種レベルの同定

The Myxomycetes; pp. 561, Univ. of Iowa Press, Iowa (1969) (①参照)によれば、モジホコリ属(*Physarum*)には84種が報告されており、その後、少なくとも10種が付け加えられている。MCI 2526号菌は、子実体の柄の上に多頭の胞子嚢が生じることから、種はモジホコリ(モジホコリカビ *Physarum polycephalum*)であることが判明している。

【0016】MCI 2526号菌は、神谷宜郎博士(N. Kamiya, 元、大阪大学教授、国立基礎生物学研究所教授)が、1939年から1942年にかけてペンシルバニア大学のDr. W. Seifrizの研究室から入手した株の一つ(PPO株と名付けられている)であり、1954年にお茶の水大学に譲渡され、1965年以降 *Journal of General Microbiology*; 25, 47, (1961)の方法に従って、無菌的に変形体培養を行い、更に、胞

(4)

特開平5-230088

5

子形成を行わせ、単胞子培養を行って、単相アメーバのJ株及びF株を分離 (Botanical Magazine (Tokyo), 86, 290; 1973) したその単相アメーバのJ株を本発明に用いている。

【0017】モジホコリ属 (Physarum) は一般に、他の菌類の場合に見られるようにその性状が変化しやすい。

【0018】ATCCには、この菌種フィザルム・ポリセファラム (Physarum Polyccephalum) の菌株24112, 24466, 24467, 24738, 24739, 26788, 36822, 38898, 38899, 38900, 38901, 38902, 42489, 42601, 42602, 42604, 42605, 42627, 44490, 44491, 44912, 52728が寄託されており、MCI 2526号菌はこれらのいずれとも起源を異にするが、当該生理活性物質の生産能を有するものであれば本発明の方法に使用が可能であり、例えば、上記以外にも、MCI 2526号菌の、またはこの株に由来する突然変異体 (自然発生または誘発性) の、形質接合体または遺伝子組換え体であっても、当該生理活性物質の生産能を有するものは全て本発明の方法に使用することができる。

【0019】本発明においては、前記の菌を通常の微生物が利用しうる栄養物を含有する培地でバクテリアと共に二員培養する。栄養源としてはグルコース、水アメ、デキストリン、シュクロース、デンプン、糖蜜、動・植物油等を使用できる。また窒素源として大豆粉、小麦胚芽、コーンステープ・リカー、綿実粕、肉エキス、ペプトン、酵母エキス、硫酸アンモニウム、硝酸ソーダ、尿素等を使用できる。その他必要に応じて、ナトリウム、カリウムカルシウム、マグネシウム、コバルト、塩素、リン酸、硫酸及びその他のイオンを生成することのできる無機塩類を添加することは有効である。また菌の生育を助け、上記式で表される生理活性物質 (以下、当該生理活性物質と記す。) 生産を促進するような有機及び無機物を適当に添加することができる。

【0020】培養法としては、好氣的条件下での培養法、特に寒天培地上での暗所培養が最も適している。培養に適当な温度は20℃～25℃であるが多くの場合、24℃付近で培養する。また、当該生理活性物質生産菌を培養する前に、この餌となる微生物、例えばエアロバクター属の細菌を作製した寒天培地上に接種し、育成させておく。具体的には、このようなエアロバクター属の細菌としてはエアロバクター・エアロゲネス (Aerobacter aerogenes) MCI 2517号菌が挙げられ、かかる菌株は微工研菌寄第11577号 (FERM P-11577) として寄託されている。

【0021】本発明の生理活性物質の生産は、培地や培

6

養条件等により異なるが、通常4～5日間でその蓄積量が最高に達する。この時点で培養を停止し、培養物から目的物質を単離精製する。本発明において、当該生理活性物質の培養物からの採取に当たっては、その性状を利用した通常の方法、例えば、溶剤抽出法、イオン交換樹脂法、吸着または分配カラムクロマト法、ゲルろ過法、透析法、沈殿法等を単独でまたは適宜組み合わせで抽出精製することができる。例えば、当該生理活性物質は、培養菌体中からはメタノールとクロロホルム/メタノールで抽出し、減圧下で濃縮する。濃縮液をイオン交換クロマトグラフィー、分取薄層クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、逆相高速液体クロマトグラフィー等を組み合わせて精製すると、純粋な当該生理活性物質が得られる。

【0022】

【実施例】以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はその要旨を越えない限り、以下の実施例に限定されるものではない。

実施例1

(1) 培養

グルコース5.0g、酵母エキス0.5g、バクトペプトン5.0g、リン酸二水素カリウム (KH_2PO_4) 2.3g、リン酸水素二カリウム (K_2HPO_4) 1.5g、硫酸マグネシウム7水塩 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0.5g、寒天30gを1リットルの蒸留水で調整し、滅菌後シャーレに分注し、厚さ0.7cmの寒天培地を作製した。

【0023】別に、粘菌アメーバの餌となるエアロバクター・エアロゲネス (Aerobacter aerogenes) MCI 2517号菌を斜面培地より白金耳を用い液状培地 (上記培地中から寒天を抜いたもの) 中へ植菌し、24℃において、1日暗所で培養した。作製した寒天培地 (直径20cmのシャーレ) 上に、前記種培養液を2～3滴接種し、一面に広げ、更に24℃において2日間暗所で培養した。エアロバクター・エアロゲネスMCI 2517号菌を育成した寒天培地上に、白金耳を用い真性粘菌MCI 2526号菌の単相アメーバの増殖先端部をかきとり、前記シャーレに植菌し、24℃において4～5日間暗所培養した。

【0024】シャーレー面に育成した単相アメーバを寒天培地上から採取し、エアロバクター・エアロゲネスMCI 2517号菌を除去するために数十倍量の蒸留水に懸濁し、500～1000回転/分で遠心分離を行い上清を除いた。この操作を数回繰り返し、上清がきれいになったところで、再び蒸留水を加え、3000～3500回転/分で遠心分離し培養菌体を得た。この菌体は、エタノール中に懸濁し、-8.0℃で保存した。

【0025】(2) 培養物の精製

前記(1)で得られた菌体 (シャーレ50枚×2) に、20倍量のメタノールを数回に分けて加え、30分間超

(5)

特開平5-230088

7

音波破碎装置にかけ、その後遠心分離機で上清を分離し抽出した。同様の操作で、前記沈殿物をクロロホルム：メタノール＝1：2、クロロホルム：メタノール＝1：1、クロロホルム：メタノール＝2：1の順番で抽出し、各々の得られた抽出液を全て混合し、減圧下濃縮乾固し抽出物を得た。

【0026】これを、再びメタノールに溶かし、超音波破碎装置にかけた後、遠心分離機で上清を沈殿物より分離した。同様の操作で、クロロホルム：メタノール＝1：2、クロロホルム：メタノール＝1：1の順番で抽出し、各々の得られた抽出液を全て混合し、減圧下濃縮乾固し抽出物を得た。次に、これを少量のクロロホルム：メタノール＝1：2に溶かし、同溶媒で平衡下充填したDEAE-セファデックスのカラムにのせ、同溶媒でイオン交換クロマトグラフィーを行った。DNAポリメラーゼα阻害活性画分を集め、減圧下濃縮乾固し抽出物を得た。

【0027】さらに、これを少量のクロロホルム：メタノール＝1：2に溶かし、分取薄層クロマトグラフィー（60プレート）にのせ、クロロホルム：メタノール：水＝60：40：9の混合溶媒で展開し、活性画分（ $R_f = 0.50 \sim 0.65$ ）を削り取り、10倍量のメタノールを加え、30分間超音波破碎装置にかけた後、遠心分離機で上清を分離し抽出した。同様の操作で、クロロホルム：メタノール＝1：2、クロロホルム：メタノール＝1：1、クロロホルム：メタノール＝2：1の順番で抽出し、各々の得られた抽出液を全て混合し、減圧下濃縮乾固し抽出物を得た。

【0028】これを再び、分取薄層クロマトグラフィー（14プレート）にのせ、クロロホルム：メタノール：酢酸：水＝10：2：2：4の混合溶媒で展開し、活性画分（ $R_f = 0.45 \sim 0.60$ ）を削り取り、10倍量のメタノールを加え、30分間超音波破碎装置にかけた後、遠心分離機で上清を分離し抽出した。同様の操作で、クロロホルム：メタノール＝1：2、クロロホルム：メタノール＝1：1、クロロホルム：メタノール＝2：1の順番で抽出し、各々の得られた抽出液を全て混合し、減圧下濃縮乾固し抽出物を得た。

【0029】得られた抽出物を少量のクロロホルム：メタノール＝1：1に溶かし、遠心分離機にかけ不溶物を除き、同溶媒で充填したセファデックスG-15のカラムにのせ、同溶媒でゲル濾過を行った。活性画分を集め、減圧下濃縮乾固し抽出物を得た。更にこれをメタノール：水＝6.5：3.5に溶かし、遠心分離機にかけ不溶物を除き、同溶媒を用い逆相高速液体クロマトグラフィー（HPLC 島津6Aシリーズ）で精製した。用いたカラムは、TSK-ODS-80TM、 0.46×15 cm、溶出速度は、1 ml/min、温度は35℃に設定した。フラクションNo. 14～17に活性物質が溶出したが、最も活性が高かったのはNo. 15であり、減圧

8

下濃縮乾固の結果、約250 μg活性物質が得られた。同物質は、以下の物性から上記した式で表される。

【0030】1) 分子量

426

マトリックス剤にグリセリンを使用し、高速原子衝撃イオン化法マスペクトロメトリー（FAB-MS）により測定した。 $M/z = 427$ にプロトン化イオン（ $M+H$ ）⁺が観測された。測定したスペクトルを図1に示す。

10. 【0031】2) 分子式

$C_{16}H_{17}O_7 \cdot PNa$

【0032】3) 赤外吸収スペクトル（FT-IR）

測定したスペクトルを図2に示す。

【0033】4) 水素核磁気共鳴スペクトル

重クロロホルム：重メタノール＝1：1の溶媒中で測定した500.02 MHz水素核磁気共鳴スペクトルを図3に示す。

【0034】5) J相関 $^1H-^1H$ 2次元核磁気共鳴スペクトル（ $H-H$ COSY）

20. 重クロロホルム：重メタノール＝3：1の溶媒を用い、共鳴周波数は 1H 500.02 MHz、位相検出2量子フィルター法で測定した。観測幅は5 kHz、データ点は、 t_2 軸512、 t_1 軸128にとり、データ処理時に t_1 軸のみ4倍にゼロ・ファイリングした。測定したスペクトルを図4に示す。

【0035】6) 異種核間（ $^1H-^{13}C$ ）J相関 2次元核磁気共鳴スペクトル（ $H-C$ COSY）重クロロホルム：重メタノール＝3：1の溶媒を用い、HMQC法（水素核観測による高感度スペクトル測定法）で、 $1/\gamma = 2J = 3.5$ msec（ $J \sim 14.3$ Hz）、 3.1 msec（ $J \sim 16.1$ Hz）の2点につき測定を行った。共鳴周波数は、 1H 500.02 MHz、 ^{13}C 125.8 MHz、観測幅は、 t_2 （ 1H ）軸 4 kHz、 t_1 （ ^{13}C ）軸 2.5 kHz、データ点は、 t_2 軸512、 t_1 軸128にとり、データ処理時に t_1 軸のみ4倍にゼロ・ファイリングした。測定したスペクトルを図5、図6に示す。

【0036】7) NOE相関 $^1H-^1H$ 2次元核磁気共鳴スペクトル（NOESY）

重クロロホルム：重メタノール＝3：1の溶媒を用い、共鳴周波数は、 1H 500.02 MHzで測定を行った。データ点は、 t_2 軸512、 t_1 軸128にとり、データ処理時に t_1 軸のみ4倍にゼロ・ファイリングした。測定したスペクトルを図7に示す。

【0037】8) ^{31}P 核磁気共鳴スペクトル

重クロロホルム：重メタノール＝3：1の溶媒を用い、共鳴周波数は ^{31}P 202.5 MHzで、測定したスペクトルを図8に示す。

9) CADスペクトル

本発明の生理活性物質を5 NのNaCl中、70℃にて5時間加水分解した後ジエチルエーテルで抽出し、それを

(6)

特開平5-230088

9

負イオンFAB/MS測定した。 $m/z=267$ に検出されたカルボン酸由来と考えられるイオンから、磁場強度を調整することにより親イオンを選択し、電場電圧を走査し、MS/MS分析した。FAB/MS測定ならびにMS/MS分析の条件は下記の通り。

【表2】FAB/MS測定条件

装置 : VG社 ZAB-HF質量分析計
 データ処理 : VG社 11/250データ処理システム
 イオン化方式 : FAB
 測定イオン : 負イオン
 衝突原子 : キセノン
 衝突原子加速電圧 : 約8kV
 FAB銃エミッション電流 : 約1mA
 マトリックス : ジエタノールアミン
 イオン加速電圧 : 8.0kV
 走査速度 : 3.0sec./decade
 走査間隔 : 2sec.
 走査範囲 : $m/z=10\sim1000$
 MS/MS分析条件
 走査部 : 電場
 走査速度 : 1.0sec.
 走査範囲 : 8keV \sim 50.0eV
 衝突ガス : ヘリウム (ガス圧 2×10^{-6} mbar)
 積算回数 : 10回

その他の条件はFAB/MS測定条件と同じ。測定したスペクトルを図9に示す。各ピークは CH_2 を示しており、本発明の生理活性物質が上記式で表されることがわかった。

【0038】試験例1.

【DNAポリメラーゼ α 阻害活性試験】基質として、活性化DNA、デオキシリボヌクレオチド三リン酸(dNTPs)、トリチウム標識したデオキシチミジン三リン酸(3H -dTTP)を用い、実施例1で得られた生理活性物質の、精製された牛胸腺由来DNAポリメラーゼ α [バイオケミカ バイオフィジカ アクタ (Biochimica et Biophysica Acta) 950, 1988 263~273] に対する阻害

10

活性を測定した。

【0039】牛胸腺由来DNAポリメラーゼ α 5ng, 活性化DNA 2 μ g, dNTPs 20 μ M (0.4 μ Ci 3H -dTTPを含む), 2-メルカプトエタノール 2mM, 牛血清アルブミン 400 μ g/ml, 10%グリセロール, 塩化マグネシウム 1.0mM, トリス塩酸塩 50mM (PH7.5) を混合し、得られた反応液を 50 μ l とし、当該生理活性物質を 0, 1.4, 3.5, 7.0, 14.0, 21.0, 28.0ng 加え、各々 37 $^{\circ}$ C で 60 分間保温し反応させた。

【0040】反応後、これを円形ろ紙 (Whatman 3MM) にスポットし、10%トリクロロ酢酸で15分間洗浄後、5%トリクロロ酢酸で15分間3回洗浄を繰り返し、更に99%エタノールで洗浄した後、ろ紙を乾燥させた。ろ紙上の放射活性を、トルエンシンレーターの中で、液体シンチレーションカウンター (Packard社, Tricarb 3255) を用いて測定し、合成されたDNAの定量を行った。その結果を図10に示す。

20 【0041】試験例2

【各種由来DNAポリメラーゼ α 阻害活性試験】 Tris-HCl (pH7.5) 40mM, デオキシアデニン三リン酸 (dATP) 2.0 μ M, デオキシシトシン三リン酸 (dCTP) 2.0 μ M, デオキシグアニン三リン酸 (dGTP) 2.0 μ M, デオキシチミジン三リン酸 (dTTP) 1.0 μ M, MgCl $_2$ 7mM, KCl 50mM, ウシ血清アルブミン (BAS) 10 μ g, 10%グリセロール, 2-メルカプトエタノール 2mM, 活性化DNA 2 μ g, DNAポリメラーゼ α 0.05ユニット, 本発明の生理活性物質 0.25 μ を混合し、得られた反応液を 25 μ l と下。この反応液を 37 $^{\circ}$ C にて 60 分間 (Physarum Polycephalum 由来のDNAポリメラーゼ α を含んでいるものは 25 $^{\circ}$ C にて 60 分間) 反応させ、当該生理活性物質に取り込まれた放射活性を上記試験例1と同様の方法により測定した。その結果を表-1に示す。

【表3】

(7)

特開平5-230088

11
表-1

12

DNAポリメラーゼ α の由来	DNAポリメラーゼ α 活性		阻害率 (%)
	-PHYLPA (μmol)	+PHYLPA (μmol)	
Raji cell	50.5	6.1	88
子牛の胸腺	44.7	4.6	90
アフリカツメガエルの卵巣	18.6	3.0	84
<i>Physarum polycephalum</i> *	32.0	12.1	62
<i>Physarum polycephalum</i> **	37.5	16.2	57

表-1中、-PHYLPAは本発明の生理活性物質を加えない場合、+PHYLPAは本発明の生理活性物質を加えた場合を示し、*はDE-I、**はDE-IIを示す。

試験例3

〔in vivoにおける癌細胞増殖抑制効果〕エムジーディービー104 (MCDB104) 培地に、インシュリン $5\mu\text{g}/\text{ml}$ 、トランスフェリン $5\mu\text{g}/\text{ml}$ 、デキサメサゾン $10\text{ng}/\text{ml}$ 、ビーディージーエフ (PDGF) $12.5\text{ng}/\text{ml}$ を加えた無血清培地を作製し、ヒト子宮頸癌由来ヒーラ細胞 (HeLa細胞) をシャーレに 10^4 個/ cm^2 接種し、 37°C で4日間 CO_2 インキュベータで培養した。

【0042】これに実施例1で得られた生理活性物質を $0.5-1\mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度で当培養系に添加したところ、HeLa細胞をほぼ100%死滅させた。一方、同様の条件下でヒト胎児肺由来ティーアイジー3細胞 (TIG-3細胞) をシャーレに 10^4 個/ cm^2 接種し、 37°C で4日間 CO_2 インキュベータで培養し、実施例1で得られた生理活性物質を $0.5-1\mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度で添加したところ、TIG-3細胞の増殖を100%抑制した。また、当培養系から当該生理活性物質を除去すると細胞の増殖能が回復し、この抑制作用は可逆的であった。

【0043】

【発明の効果】本発明の新規生理活性物質は、DNAポリメラーゼ α 阻害活性を有しており、抗癌剤としての有用性が期待される。

20 【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、正イオンFABマスペクトルを示す図である。

【図2】図2は、赤外吸収スペクトル (FT-IR) を示す図である。

【図3】図3は、水素核磁気共鳴スペクトルの全領域を示す図である。

【図4】図4は、J相関水素-水素2次元核磁気共鳴スペクトル ($^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY) を示す図である。

30 【図5】図5は、HMQC法を用い、 $1/2J=3.5\text{ms}$ で測定した異種核間 ($^1\text{H}-^{13}\text{C}$) J相関2次元核磁気共鳴スペクトルを示す図である。

【図6】図6は、HMQC法を用い、 $1/2J=3.1\text{ms}$ で測定した異種核間 ($^1\text{H}-^{13}\text{C}$) J相関2次元核磁気共鳴スペクトルを示す図である。

【図7】図7は、NOE相関水素-水素核磁気共鳴スペクトル (NOESY) を示す図である。

【図8】図8は、リン核磁気共鳴スペクトルを示す図である。

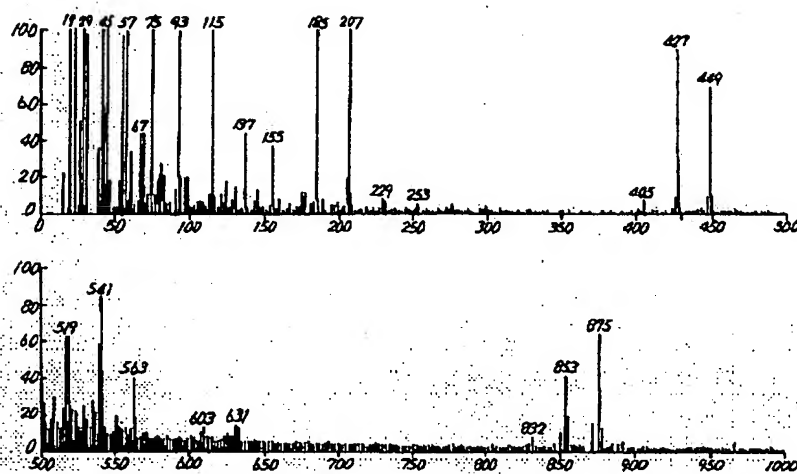
【図9】図9は、CADスペクトルを示す図である。

40 【図10】図10は、DNAポリメラーゼ α 阻害活性試験結果を示す図である。

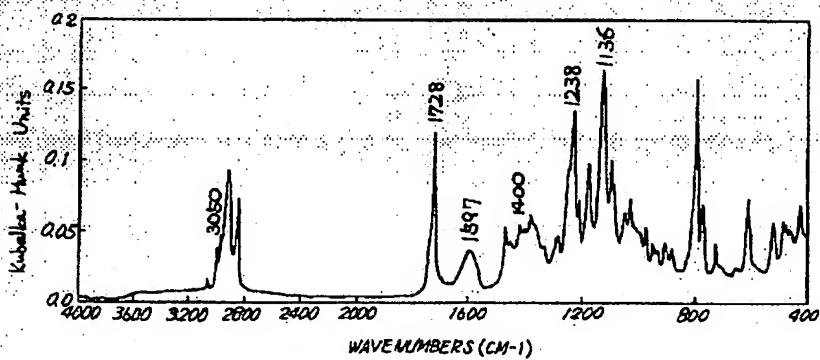
(8)

特開平5-230088

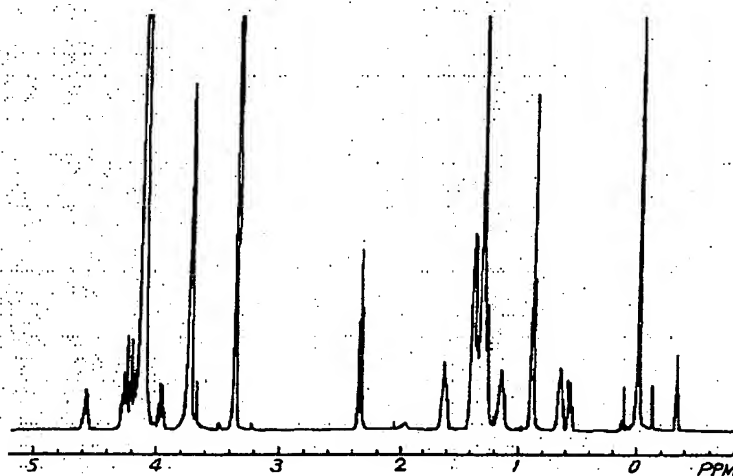
【図1】



【図2】



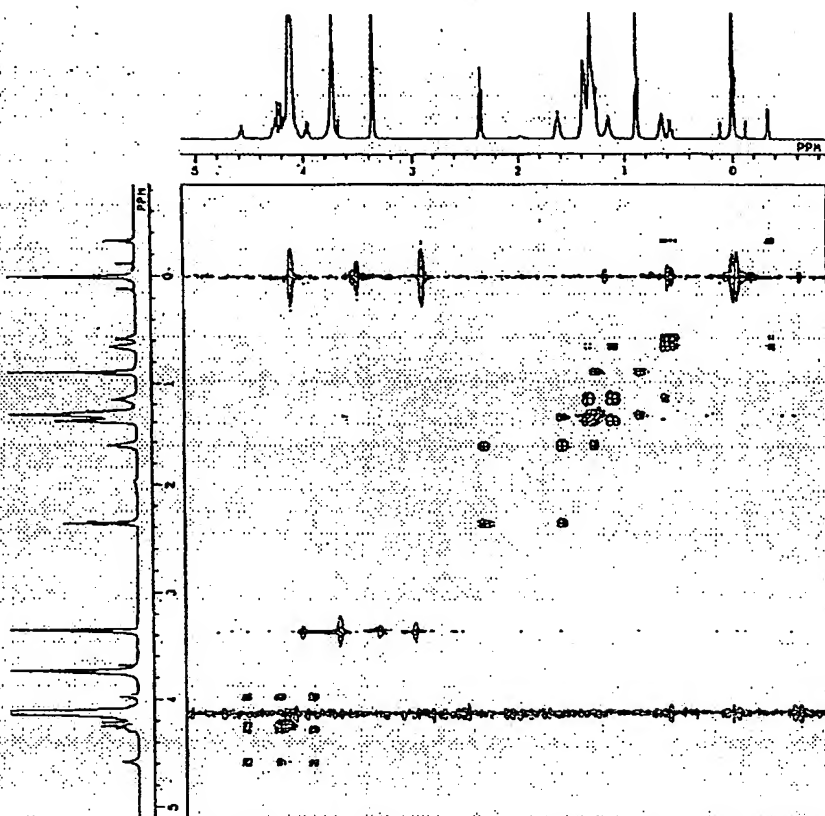
【図3】



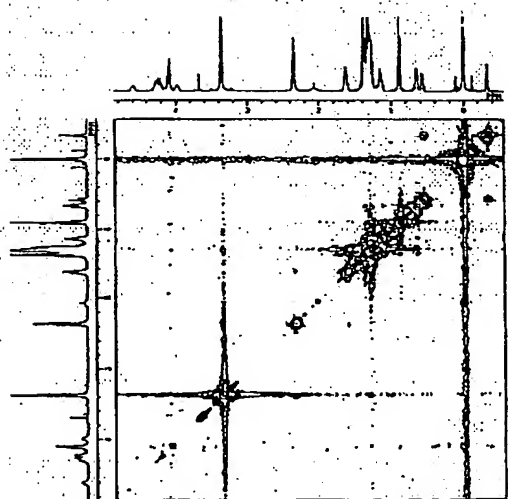
(9)

特開平5-230088

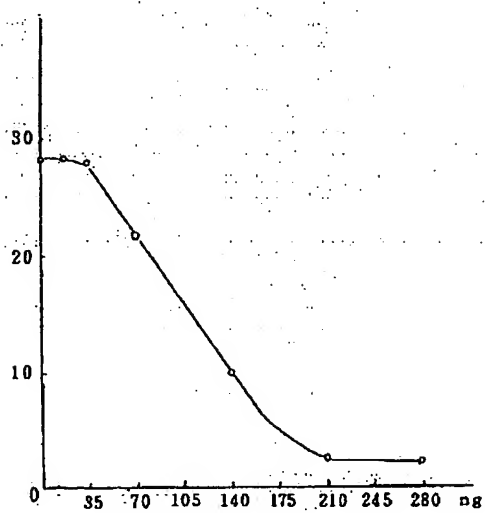
【図4】



【図7】



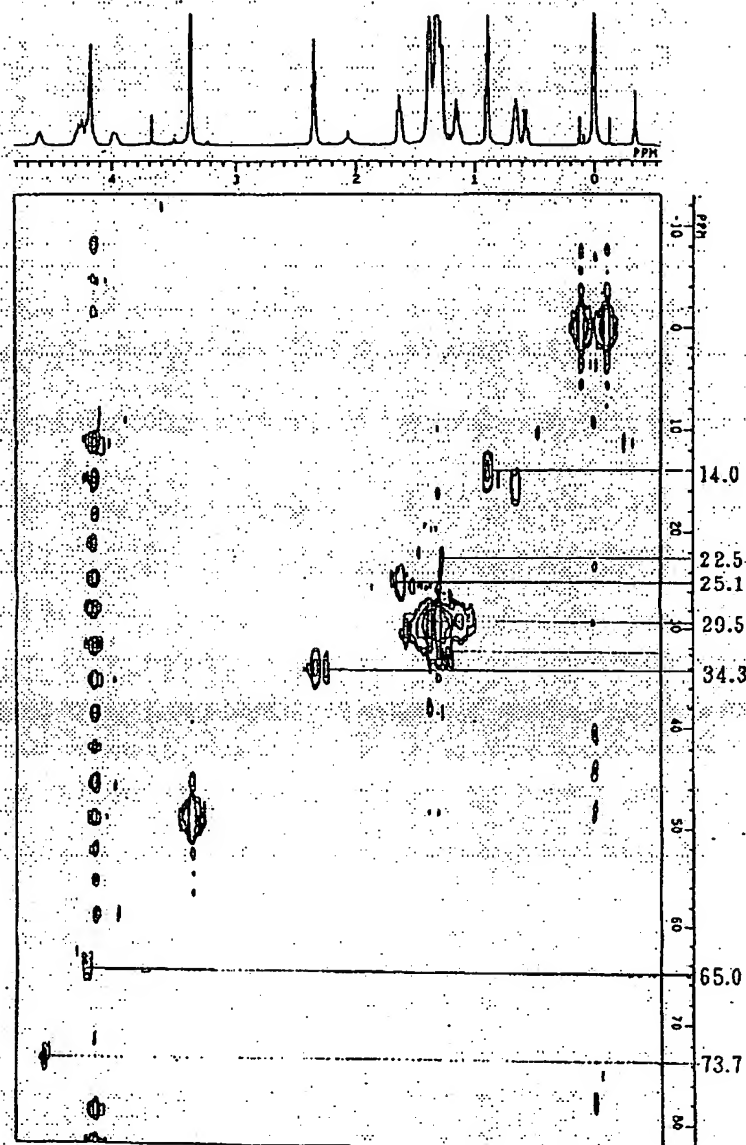
【図10】



(10)

特開平5-230088

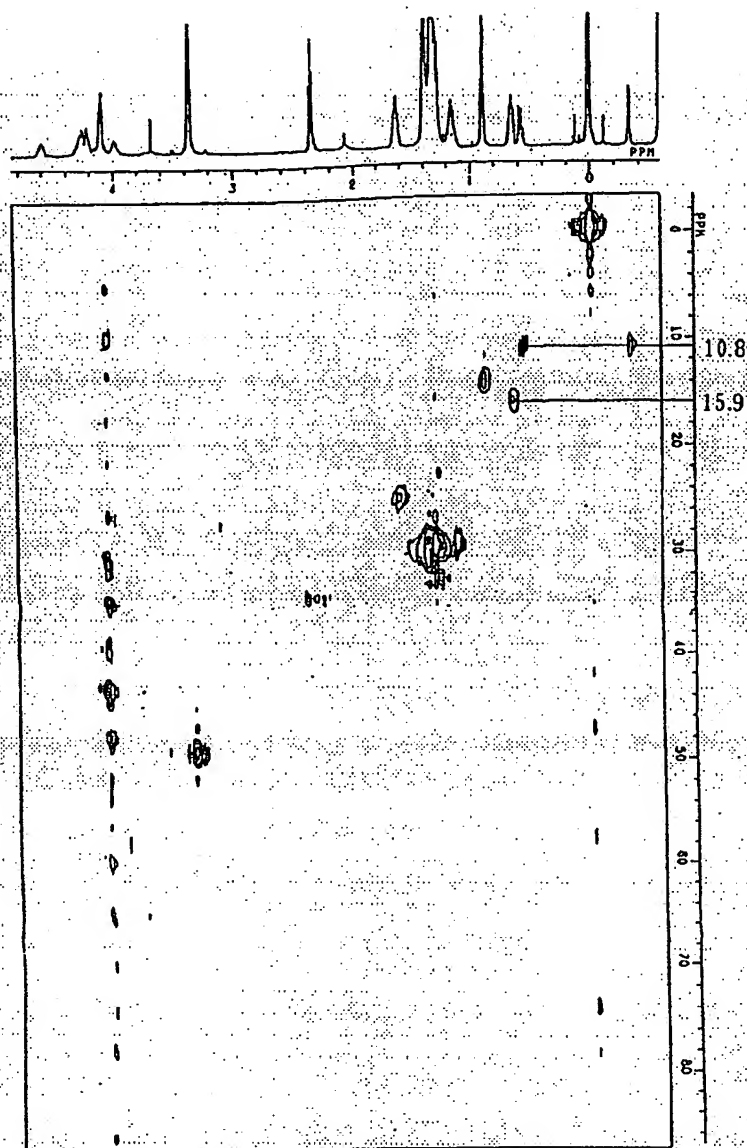
【図5】



(11)

特開平5-230088

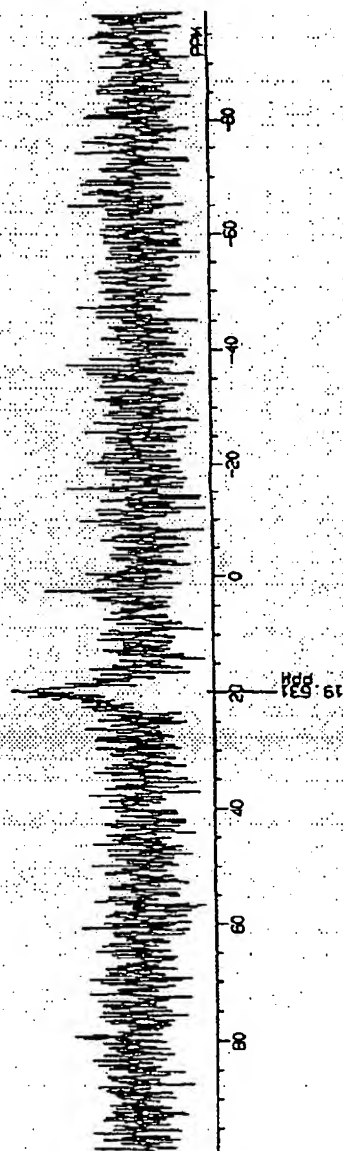
【図6】



(12)

特開平5-230088

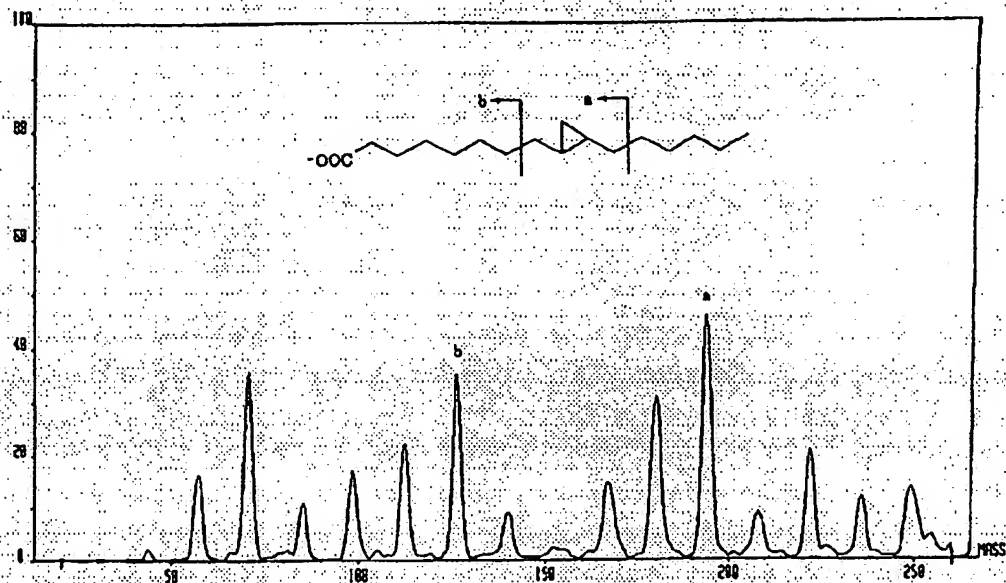
【図8】



(13)

特開平5-230088

【図9】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁵

C 12 R 1:645)

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

7804-4B